光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *ApSerpin-FA72* 的克隆、表达及功能验证

赵　钰, 刘忠渊*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要:【目的】本研究旨在对光滑鳖甲 *Anatolica polita borealis* 丝氨酸蛋白酶抑制剂基因进行克隆及表达分析,以验证光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂的功能。【方法】利用 PCR 和 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆获得光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因。采用生物信息学方法对该基因及其编码蛋白的基本性质进行预测和分析,同时构建其编码产物的系统进化树;构建光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白重组表达载体,表达、纯化蛋白进行功能验证。【结果】获得光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *ApSerpin-FA72*(GenBank 登录号: MF188125),其基因编码序列长为 1 176 bp,编码由 391 个氨基酸残基组成的多肽,蛋白理论分子量为 43.7 kD,理论等电点为 5.14,包含一个由 21 个氨基酸组成的信号肽。AsSerpin-FA72 属亲水蛋白,分泌到胞外发挥作用,可能具有胁迫应答的功能,与赤拟谷盗 *Triboloum castaneum* Serpin 的同源性最高。纯化得到的融合蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 大小约为 63.7 kD。功能验证表明,重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性均有抑制作用。【结论】光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的表达产物对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性具有抑制作用,表明其可能对消化类丝氨酸蛋白酶活性起抑制作用,对其功能活性的验证有助于深入研究 ApSerpin-FA72 与丝氨酸蛋白酶之间的关系。

关键词: 光滑鳖甲; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 原核表达; 蛋白纯化; 功能验证

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)08-0857-08

Cloning, expression and functional verification of the serine protease inhibitor gene *ApSerpin-FA72* from *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae)

ZHAO Yu, LIU Zhong-Yuan* (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone and analyze the expression of a serine protease inhibitor gene from *Anatolica polita borealis* so as to verify its function.【Methods】A serine protease inhibitor gene from *A. polita borealis* was cloned using PCR and RACE methods. Bioinformatics approach was applied to analyze the basic properties of the gene and its coded protein, and to make the multiple sequence alignment with its homologous sequences. The recombinant expression vector pET-32a-ApSerpin-FA72 was constructed. The expression, purification and functional verification of the recombinant target protein were analyzed.【Results】A serine protease inhibitor gene was cloned from *A. polita borealis* and named *ApSerpin-FA72* (GenBank accession no.: MF188125). Its opening reading frame (ORF) is 1 176 bp in length, encoding a 391 amino-acid residue with the predicted molecular weight of 43.7 kD and pI of 5.14. ApSerpin-FA72 is a hydrophilic protein with a signal peptide of 21 amino acids at the terminus. It might play roles in the stress response and immune response, and has the highest homology with *Tribolium castaneum* Serpin. The purified recombinant protein TrxA-ApSerpin-FA72 has the molecular

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460578)

作者简介: 赵钰, 女, 1992 年 3 月生, 新疆伊犁人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 1457192876@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzy1168@163.com

收稿日期 Received: 2017-04-23; 接受日期 Accepted: 2017-07-04

weight of 63.7 kD. The functional verification results revealed that the recombinant protein TrxA-ApSerpin-FA72 had an inhibitory effect on the activities of trypsin and chymotrypsin. 【Conclusion】The expression product of *Anatolica polita* serine protease inhibitor gene has an inhibitory effect on trypsin and chymotrypsin, indicating that it may inhibit the activity of digestive serine protease, and the verification of its functional activity can be helpful to further investigate the relationship between ApSerpin-FA72 and serine protease.

Key words: *Anatolica polita borealis*; serine protease inhibitor; prokaryotic expression; protein purification; functional verification

丝氨酸蛋白酶抑制剂是一类分布广泛的蛋白酶抑制剂超家族,其结构保守、功能多样的内源水解酶占总蛋白酶类的三分之一。丝氨酸蛋白酶抑制剂能与生物体内参与各种调控作用的丝氨酸蛋白酶相互制约,形成一定的动态平衡,调节许多重要的生命活动(王磊等, 2014)。丝氨酸蛋白酶抑制剂一般由350~400 个氨基酸残基组成,较多的多达 500 个氨基酸,一般含有一个暴露在分子表面的位于羧基末端的活性中心环(郝振宇等, 2011)。丝氨酸蛋白酶抑制剂的靶标蛋白酶在其反应中心环中裂解键切割并与之形成共价的紧密结合,形成较为稳定的酰基-酶结合物。这种结合使得靶酶的活性位点构象改变,进而失去蛋白酶活性(郝振宇等, 2011),从而被相应的丝氨酸蛋白酶抑制剂不可逆地抑制(Gettins, 2002)。

丝氨酸蛋白酶在整个生物界分布广泛,通常分布在真核生物,细菌和古细菌,以及某些病毒中(Lu *et al*., 2014),在昆虫各组织中均有分布,在昆虫体内的生长发育、食物消化、凝集和免疫应答等各方面都发挥着巨大的作用。现如今,越来越多的研究数据证明丝氨酸蛋白酶抑制剂在昆虫体内具备多种功能,对丝氨酸蛋白酶抑制尤为明显。蜘蛛的丝氨酸蛋白酶抑制剂对血纤维蛋白溶酶、弹性蛋白酶、微生物丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性具有抑制作用(Wan *et al*., 2013)。在大部分蜜蜂中,胰凝乳蛋白酶抑制剂对组织蛋白酶 G 和弹性蛋白酶活性具有抑制作用(Kim *et al*., 2013)。在中华蜜蜂 *Apis cerana* 中,丝氨酸蛋白酶抑制剂能抑制枯草芽孢杆菌蛋白酶 A (subtilisin A)和蛋白酶 K 活性(Kim *et al*., 2013)。大黄蜂 *Bombus impatiens* 及蛇毒丝氨酸蛋白酶抑制剂表现出对纤溶酶活性的抑制(Choo *et al*., 2012; Qiu *et al*., 2013)。在家蝇 *Musca domestica* 幼虫中,其丝氨酸蛋白酶抑制剂也表现出对弹性胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性的抑制(Tang *et al*., 2016)。

新疆地处欧亚大陆腹地,气候干旱,其中鞘翅目(Coleoptera)昆虫是最具有代表性的一类昆虫,光滑鳖甲 *Anatolica polita borealis* 隶属于拟步甲科(Tenebrionidae)鳖甲族(Tentyriini)鳖甲属 *Anatolica*,是一类广泛分布的荒漠昆虫(马延龙等, 2009)。光滑鳖甲可能存在独特的免疫调控防御机制(海力且木·艾力等, 2016),目前对光滑鳖甲如何防御外来微生物的感染、体内免疫防御相关因子有怎样的变化规律、如何应答激活相关信号通路而产生抗菌肽等问题都有待于研究,其中丝氨酸蛋白酶抑制剂可能在其独特免疫调控防御机制过程中起关键作用,因此本研究以光滑鳖甲为对象,通过RACE-PCR 技术克隆得到其丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *ApSerpin-FA72*,对其进行表达及功能活性验证可为深入研究 ApSerpin-FA72 提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试虫

光滑鳖甲成虫采自新疆阜康市(44°24′N, 87°51′E, 海拔 444 m) 222 团,采样地点位于古尔班通古特沙漠南缘地带,年均温度为 5~7.5℃,最高气温高于 40℃,最低气温低于 -40℃;每年的采样时间为 4 月中下旬和 9 月中上旬。

1.2 工具酶及主要试剂

SMARTer^{TM} RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clotech 公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, DNaseI、RNase Inhibitor、Oligo(dT)$_{18}$ Primer、Reverse Transcriptase M-MLV(RNaseH)和 pMD18-T 载体等均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),DNA Marker、Taq 酶、质粒 DNA 小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司,感受态细胞菌种 Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司,胰蛋白酶(trypsin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)及其分别对应的底物 N-苯甲酰-L-缬氨酰甘氨酰-L-

精氨酸对硝基苯胺盐酸盐（N-benzoyl-Val-Gly-Arg-p-Nitroanilide）和 N-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基酰苯胺（N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid）购自 Sigma 公司。其余试剂为国产分析纯。引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.3　细菌诱导

将过夜培养的大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphyloccocus aureus* 稀释至 OD_{260}/OD_{280}为 0.6～0.8，等比例混合两种菌液，用针刺感染的方法向光滑鳖甲 5 龄幼虫体内注射混合菌液 5 μL；14～16 h 后提取其总 RNA（刘辉和叶湘漪，2009）。

1.4　光滑鳖甲总 RNA 的提取

按照 Invitrogen 公司 RNA 提取试剂盒说明进行操作。提取的总 RNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。分别在 260 和 280 nm 的紫外光下检测其吸光值，计算 RNA 浓度（王鹏等，2012）。

1.5　光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆

从细菌诱导的光滑鳖甲 5 龄幼虫抑制差减 cDNA 文库中筛选到丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的 EST 序列，对其编号为 FA72。参照 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒中的 5′RACE 技术克隆获得丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的 5′末端克隆序列。根据其 EST 序列使用 Primer5 软件设计 5′引物分别为 5′-RACE Outer 和 5′-RACE Inner，克隆全长丝氨酸蛋白酶抑制剂基因序列的引物为 U 和 D（表 1）。以 cDNA 作为模板进行 PCR，使用 ExTaq™ DNA 聚合酶（TaKaRa）进行 PCR 扩增，PCR 反应体系：ExTaq™ DNA 聚合酶 0.2 μL，10 × 扩增 buffer 2.5 μL，dNTP Mix（2.5 mmol/L each）2.5 μL，正向引物（10 μmol/L）1.0 μL，反向引物（10 μmol/L）1.0 μL，cDNA 模板 2.0 μL，灭菌水 16.3 μL。PCR 的反应程序：94℃ 5 min；94℃30 s，56℃ 1 min，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min，然后对 PCR 产物纯化、克隆和测序。

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primers	引物序列 Primer sequences（5′－3′）	用途 Purpose
5′-RACE Outer	GATGAACGCTTTCTGGACAACCT	5′RACE
5′-RACE Inner	TGGTCTCTACTTTGAATCTGGGC	
U	GGGGACGTAAATTTAAAATGAGGAG	全长 cDNA 克隆
D	CTTTAAAACGATGCAATTCTTCCCATG	Cloning of the full-length cDNA
F	G<u>GAATTC</u>GACCCATTGACAAAGAT	重组表达
R	CC<u>CTCGAG</u>CAATAAGCAAATAACG	Recombinant expression

下划线为酶切位点 The restriction sites are underlined.

1.6　基因的生物信息学分析

使用在线程序 ORF finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/）预测目的基因的开放阅读框。利用 SWISS-MODEL（http://Swiss model.expasy.org/interactive）在线软件预测蛋白的三级结构。从 NCBI 数据库下载 10 个物种的丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白序列，包括美国白蛾 *Hyphantria cunea*、黄粉虫 *Tenebrio molitor*、毕氏粗角猛蚁 *Cerapachys biroi*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、家蚕 *Bombyx mori*、小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、家蝇 *Musca domestica* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*，利用 MEGA5.05 软件构建系统进化树（柯野等，2012），设置的重复次数为 1 000。

1.7　光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因重组表达载体的构建

根据基因比对搜索的结果，采用引物设计软件 DNAMAN 和 Primer5.0 设计了带有 *Eco*R Ⅰ 酶切位点的引物 F（正向引物）和带有 *Xho* Ⅰ 酶切位点的引物 R（反向引物），其中下划线位置为酶切位点（表 1），去除信号肽编码序列（钱岑等，2013）。以目的基因完整 ORF 的质粒 DNA 为模板，对其进行 PCR 扩增，PCR 反应体系：ExTaq™ DNA 聚合酶 0.2 μL，10 × Taq buffer 2.5 μL，dNTP Mix（2.5 mmol/L each）2.5 μL，正向引物（10 μmol/L）1.0 μL，反向引物（10 μmol/L）1.0 μL，质粒 DNA 模板 0.1 μL，灭菌水 18.2 μL。PCR 的反应程序：94℃ 5 min；94℃ 30 s，58℃ 1 min，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min，将纯化后的 PCR 产物与 pET-32a（+）表达载体分别同时采用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 限制性内切酶进行双酶切，对酶切产物进行切胶纯化，并用 T4 DNA 连接酶将经酶切的外源片段与载体连接，获得重组质粒 pET-32a-*ApSerpin-FA*72，将连接产物转化至 Trans-T1 感受态细胞，采用菌液 PCR 方法对

转化后的克隆进行筛选与鉴定，将筛选获得的阳性克隆进行 DNA 序列测定验证。

1.8 重组光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白的诱导表达与纯化

对测序正确的菌液进行质粒抽提，将抽提获得的质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。于氨苄抗性培养基(50 μg/mL)上挑选单菌落接种到5 mL 含氨苄的 LB 液体培养基(50 μg/mL)中，在37℃ 220 r/min 的条件下培养过夜。次日菌液以1∶100 (v/v)的比例接种到新鲜的 LB 培养基，于37℃ 220 r/min 的条件下培养至菌液的 OD_{600} 达到0.6~0.8 左右。加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为0.5 mmol/L，在32℃ 170 r/min 的条件下培养4 h，12 000×g 离心1 min，弃上清，收集细菌沉淀。诱导后的菌体通过超声破菌，12 000×g 离心1 min，分别收集上清和沉淀，于15%的 SDS-PAGE 电泳检测表达产物的存在形式。利用蛋白亲和镍柱对蛋白粗提取物进行吸附。待总蛋白吸附以后，在不同咪唑梯度下洗脱纯化目的蛋白，洗脱条件：5 mmol/L 咪唑洗脱3次，10 mmol/L 咪唑洗脱3次，20 mmol/L 咪唑洗脱3次，50 mmol/L 咪唑洗脱2次，100 mmol/L 咪唑洗脱2次，150 mmol/L 咪唑洗脱2次，200 mmol/L 咪唑洗脱2次，250 mmol/L 咪唑洗脱2次，500 mmol/L 咪唑洗脱1次，每次加咪唑后结合5 min，收集洗脱液，于15%的 SDS-PAGE 电泳检测每一浓度咪唑洗脱下目的蛋白条带单一性，将目的蛋白条带单一洗脱液收集进行纯化，并用 Bradford 法测定蛋白含量，进行15%的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 检测。

1.9 重组光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白抑制丝氨酸蛋白酶活性测定

选取胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶两种丝氨酸蛋白酶进行活性抑制测定。当 A_{405} 值随丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的增加而降低时，说明其与丝氨酸蛋白酶可能发生复合体而抑制丝氨酸蛋白酶的活性。因此采用酶学方法，测定了重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对酶活性的抑制，并以 pET-32a 空载表达出的蛋白 TrxA 作为对照。这两种酶对应的底物分别为 N-苯甲酰-L-缬氨酰甘氨酰-L-精氨酸对硝基苯胺盐酸盐(N-benzoyl-Val-Gly-Arg-p-nitroanilide)、N-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基酰苯胺(N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid)(Sigma)。具体步骤为：将1 μg 重组表达的 TrxA-ApSerpin-FA72 分别与10 μL 浓度为200 ng/mL 丝氨酸蛋白酶反应液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, pH7.5)于室温下共同孵育30 min，加入200 μL 对应的特异性底物(底物终浓度为0.1 mmol/L，溶于100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/LNaCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, pH 7.5 的缓冲液中)(Zhang *et al*., 2016)。加入底物于37℃条件下孵育30 min 后，丝氨酸蛋白酶与底物形成复合物硝基苯胺，检测其剩余酶活性的 A_{405} 值，定义硝基苯胺活性单位为：每分钟 A_{405} 变化0.001为一个活性单位。同时以 TrxA 蛋白作为对照，每个处理重复3次。

2 结果

2.1 光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆

为制备质量较好的 RACE-Ready cDNA 用于序列末端克隆，提取光滑鳖甲总 RNA，经过1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其电泳条带完整性，OD_{260}/OD_{280} 值均为1.8~2.0，表明所提取的光滑鳖甲总 RNA 完整性良好(图1：A)。以 RACE-Ready cDNA 为模板克隆获得丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *ApSerpin-FA*72 (GenBank 登录号：MF188125)600 bp 长的5′端序列(图1：B)，将5′端序列与 EST 序列拼接后设计全长引物，以光滑鳖甲 cDNA 为模板克隆得到1 176 bp 的全长序列(图1：C)。

2.2 *ApSerpin-FA*72 基因编码的氨基酸序列及理化性质

ORF Finder 分析 *ApSerpin-FA*72 基因的编码区长1 176 bp，其编码391个氨基酸(图2)。使用在线软件 Protparam 及 Prptscale 预测 *ApSerpin-FA*72 基因编码蛋白的理化性质及其亲疏水性，该编码蛋白的分子量为43.7 kD，理论等电点为5.14，含酸性氨基酸(DE)13.3%，含碱性氨基酸(KR)10.8%，亲水性氨基酸(AILFWV)、极性氨基酸(NCQSTY)和带电氨基酸(RKHYCDE)的比例分别为41.2%，23.6%和28.7%；蛋白质的亲水性平均数为－0.028，是可溶性蛋白质。溶液中不稳定指数为38.69，低于40，表明该蛋白可能为稳定蛋白质。利用 SWISS-MODEL(徐鑫等，2015)对其氨基酸序列进行蛋白质三维结构的同源建模，其保守结构中主要有9个α螺旋和13个β折叠形成的3个β折叠片层，其具有丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域 RCL，其为 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂(郝振宇等，2011)。

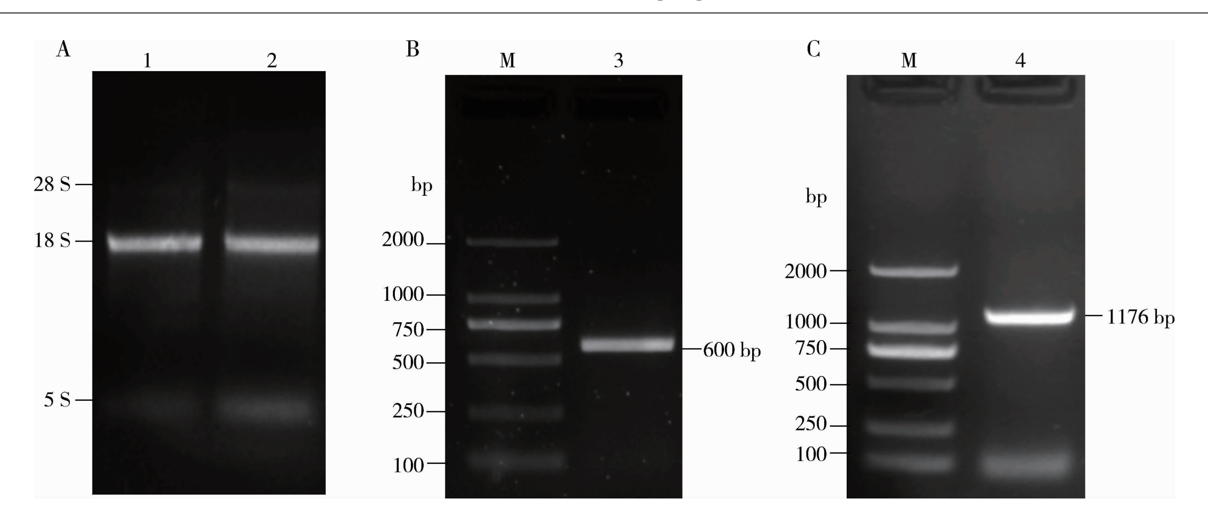


图 1　光滑鳖甲 *ApSerpin-FA72* 基因的克隆

Fig. 1　Cloning of *ApSerpin-FA72* gene from *Anatolica polita*

A：光滑鳖甲总 RNA 提取 Total RNA extracted from *A. polita*. B：*ApSerpin-FA72* 基因的 5′ RACE（5′RACE of *ApSerpin-FA72*）；C：*ApSerpin-FA72* 基因的全长扩增 PCR amplification of the full-length cDNA of *ApSerpin-FA72*. M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1，2：光滑鳖甲总 RNA 的两个样本 Total RNA from two samples of *A. polita*；3：*ApSerpin-FA72* 的 5′RACE 产物 5′RACE product of *ApSerpin-FA72*；4：*ApSerpin-FA72* 全长扩增结果 Amplified product of full-length cDNA of *ApSerpin-FA72*.

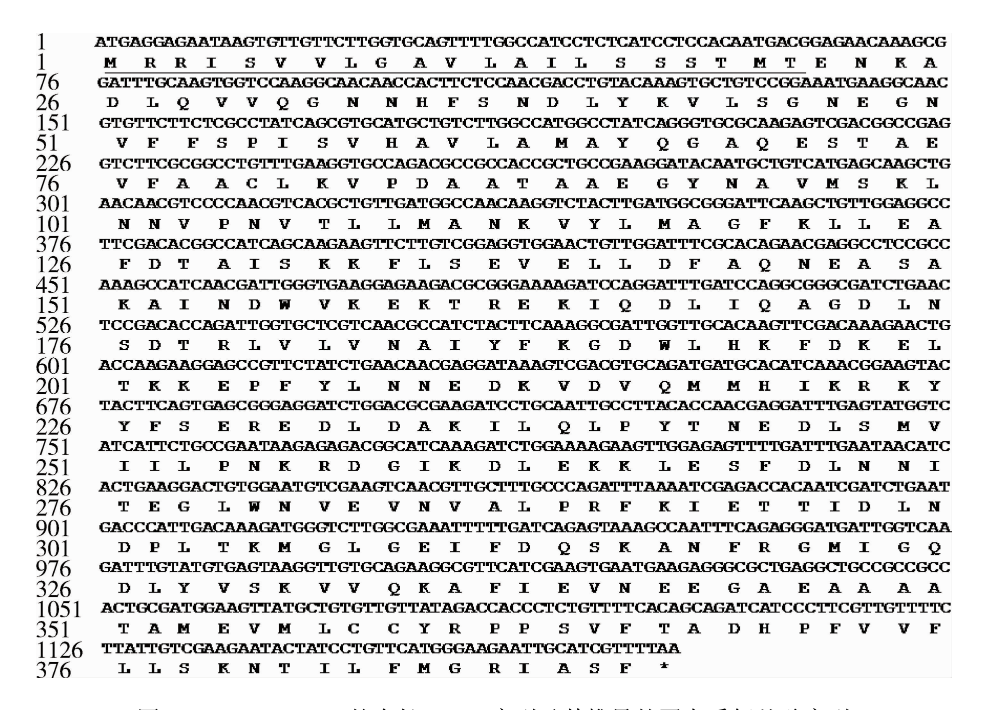


图 2　*ApSerpin-FA72* 的全长 cDNA 序列及其推导的蛋白质氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *ApSerpin-FA72*

下划线部分为信号肽。The predicated signal peptide（Signal P）is underlined.

2.3　光滑鳖甲与其他真核生物丝氨酸蛋白酶抑制剂的系统发育树

用 MEGA5.05 软件的 Neighbor-Joining 法构建 11 个物种的丝氨酸蛋白酶抑制剂氨基酸序列系统发育树。结果见图 3，ApSerpin-FA72 与同为拟步甲科的赤拟谷盗 *Triboloum castaneum* 的亲缘关系最近。

2.4　ApSerpin-FA72 表达载体的构建与重组蛋白的诱导表达

将已验证的 pET32a-*ApSerpin-FA72* 重组表达质粒转入表达菌 BL21(DE3)进行 IPTG 诱导表达。将菌体溶于适量的结合缓冲液中，经超声波破碎，高速

离心后分别取上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 电泳检测（图 4：A）。在离心上清及沉淀中，都检测发现 63.7 kD 左右的重组蛋白。上清经过镍柱亲和纯化后，经 SDS-PAGE 检测（图 4：B）及 Western blotting 检测（图 4：C）均可见 63.7 kD 左右大小的单一性条带。

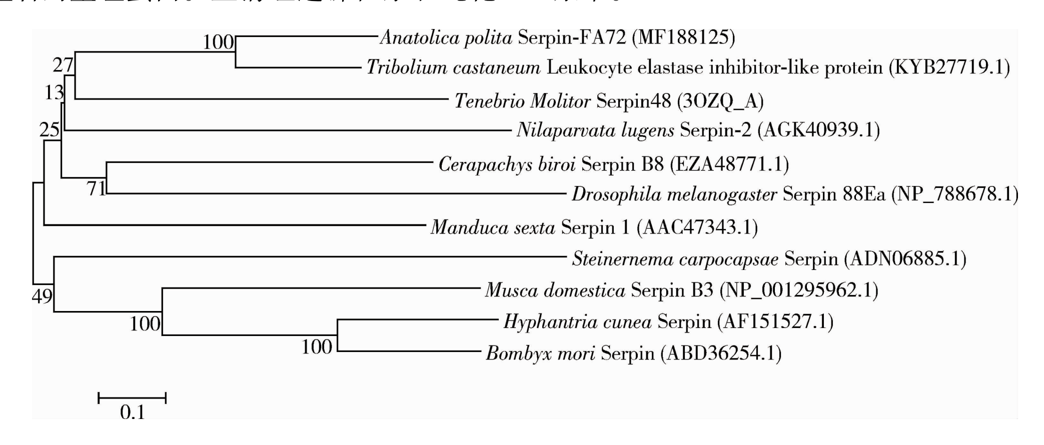


图 3 基于氨基酸序列构建的光滑鳖甲与其他真核生物丝氨酸蛋白酶抑制剂的系统发育树（邻接法，1 000 次重复）

Fig. 3 Phylogenetic tree of serine protease inhibitor of *Anatolica polita borealis* and other eukaryotes based on the amino acid sequences by Neighbor-Joining method (1 000 replicates)

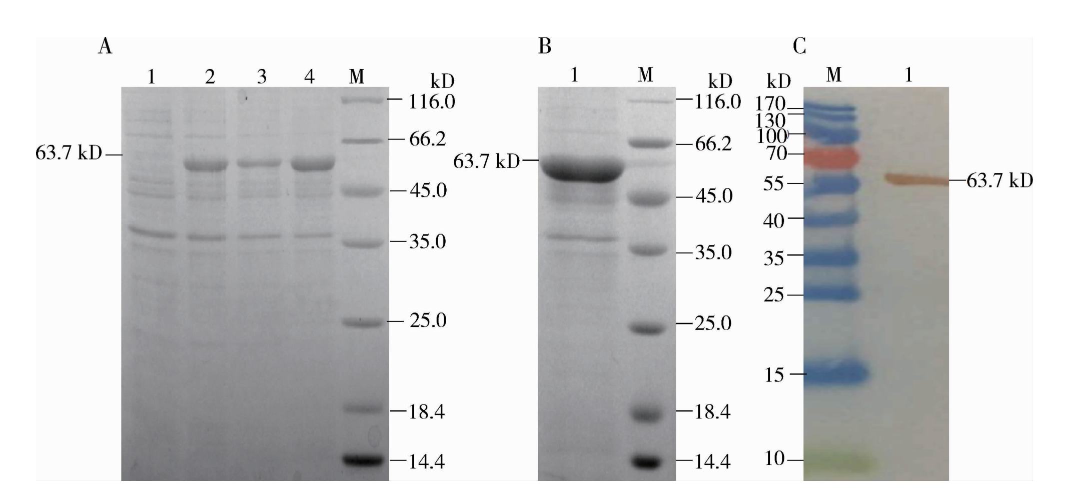


图 4 TrxA-ApSerpin-FA72 重组蛋白的表达

Fig. 4 Expression of the recombinant TrxA-ApSerpin-FA72

A：重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 诱导表达检测 Expression detection of the recombinant TrxA-ApSerpin-FA72 after IPTG induction；B：重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 镍柱纯化 TrxA-ApSerpin-FA72 purified with NAT-Ni^{2+} column；C：Western blotting. 1：未经 IPTG 诱导的菌裂解液 Lysis of *Escherichia coli* non-induced by IPTG；2：IPTG 诱导后的菌裂解液 Lysis of *E. coli* after IPTG induction；3：IPTG 诱导后的菌裂解液上清 Supernatant of *E. coli* lysis after IPTG induction；4：IPTG 诱导后的菌裂解液沉淀 Precipitate of *E. coli* lysis after IPTG induction；M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker.

2.5 重组蛋白对丝氨酸蛋白酶活性的影响

为了测定重组表达的 ApSerpin-FA72 蛋白对丝氨酸蛋白酶活性的影响，本研究选取了胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。酶活性测定结果表明，pET-32a 空载表达出的蛋白 TrxA 对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性没有抑制效果（图 5：A），而重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性均有抑制效果（图 5：B）。

3 讨论与结论

丝氨酸蛋白酶抑制剂是一类能够抑制丝氨酸蛋白酶活性的蛋白质超家族，参与调节生物体内多种生理反应，包括血液凝集、纤维蛋白溶解、补体激活、免疫黑化、生长发育过程中组织构建和程序性细胞死亡等（Qiu *et al.*，2011；Lu *et al.*，2012；Kim *et al.*，

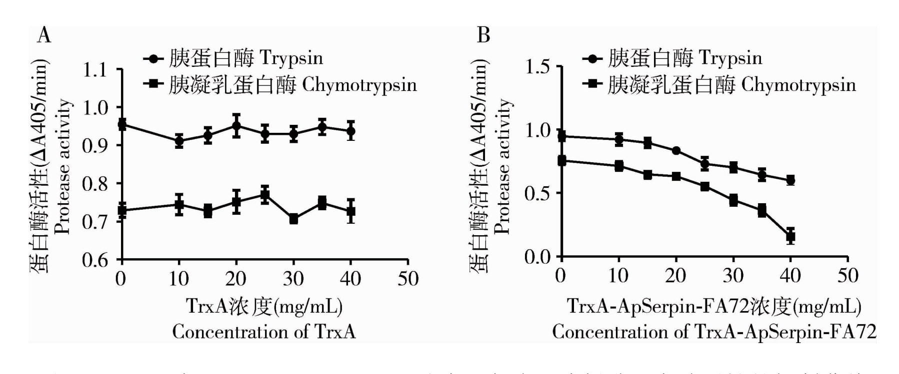


图 5　重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性的抑制曲线

Fig. 5　Dose-response inhibitory curve of the recombinant TrxA-ApSerpin-FA72 toward the activities of trypsin and chymotrypsin

TrxA：pET-32a 空载(CK)表达出的蛋白 Expressed unloaded protein of the blank vector pET-32a (CK).

2015)。在动物实验中，丝氨酸蛋白酶抑制剂能够对生命的关键途径，如凝血、补体激活、炎症等进行紧密调控(Heit *et al.*, 2013)。现如今在许多真核生物中发现大多数丝氨酸蛋白酶抑制剂能够抑制丝氨酸蛋白酶，而一些丝氨酸蛋白酶抑制剂超级家族成员可以抑制半胱氨酸蛋白酶，如抗凝血酶，或不具有蛋白酶抑制性质，如卵清蛋白、血管紧张素原和甲状腺素结合球蛋白(Dai *et al.*, 2012)。

丝氨酸蛋白酶抑制剂在昆虫各组织中均有分布，对昆虫的生命活动起到重要作用，昆虫目前是地球上最丰富的生物类群，占整个生物界的一半以上，具有极强的适应能力和防御能力。它们在长期的进化过程中形成了一套独特的天然免疫系统抵御外来微生物的感染。不同于哺乳动物，昆虫的免疫系统无 T 细胞和 B 细胞，缺乏特异的抗原-抗体反应，昆虫只有天然免疫的保护(Lu *et al.*, 2014)。寄生性蠕虫丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制宿主丝氨酸蛋白酶的活性，使其免受宿主体内蛋白酶类降解，从而逃避宿主的防御机制(Olson and Gettins, 2011; Kim *et al.*, 2015)，有利于寄生虫在宿主体内入侵和存活。

在近几十年中，丝氨酸蛋白酶抑制剂的功能已经从许多昆虫中确定，然而对于荒漠拟步甲科昆虫的研究相对贫乏。本研究主要利用 PCR 和 RACE 技术从光滑鳖甲中克隆得到了光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *ApSerpin-FA*72，并且通过多种软件和网站对其基因序列及其推导的蛋白酶性质和结构等方面进行了预测和分析。光滑鳖甲 *ApSerpin-FA*72 含有 1 176 bp 的开放阅读框，编码 391 个氨基酸。编码蛋白质理论分子量为 43.7 kD，理论等电点为 5.14，包含一个由 21 个氨基酸组成的信号肽，属亲水蛋白，与赤拟谷盗丝氨酸蛋白酶抑制剂 1 的同源性最高；构建重组质粒 pET32a-*ApSerpin-FA*72 进行表达、功能验证，经 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测证明得到大小为 63.7 kD 的融合蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72。

酶活性测定结果表明，重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶活性均有抑制作用，而 pET-32a 空载表达出的蛋白 TrxA 对这两种酶活性并无抑制作用，证明了光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂具有丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族典型的抑制丝氨酸蛋白酶活性的功能。不同丝氨酸蛋白酶抑制剂对酶活性的抑制作用也是不同的，例如，TrxA-ApSerpin-FA72 与家蝇丝氨酸蛋白酶抑制剂 MDSPI16(GenBank 登录号：AIL24303.1)都对胰凝乳蛋白丝氨酸酶活性具有抑制作用。不同的是，TrxA-ApSerpin-FA72 也对胰蛋白酶活性具有抑制作用，而 MDSPI16 不具有此作用。重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 与亚洲玉米螟丝氨酸蛋白酶抑制剂 Ofserpin1(GenBank 登录号：AAC47338)对胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶活性均有抑制作用，但重组蛋白 TrxA-ApSerpin-FA72 对胰凝乳蛋白酶活性的抑制作用更为明显，Ofserpin1 则反之。这些结果表明，光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂 ApSerpin-FA72 可能还有特殊的功能，这为我们进一步研究光滑鳖甲丝氨酸蛋白酶抑制剂奠定基础，对其分子机制的研究为荒漠昆虫独特的免疫调控防御机制提供依据。

参考文献(References)

Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Qiu Y, Wan H, Mi RS, Hung DS, Byung RJ, 2012. Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PLoS ONE*, 7(2): e32269.

Dai H, Ciric B, Zhang GX, Rostami A, 2012. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune

encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. *J. Neuroimmunol.*, 245(1-2): 1-7.

Gettins PGW, 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.*, 102(12): 4751-4804.

Hailiqiemu A, Xu X, Liu ZY, 2016. Optimization of prokaryotic expression conditions and the antibacterial activity of a novel antimicrobial peptide from *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(1): 8-15. [海力且木·艾力, 徐鑫, 刘忠渊, 2016. 光滑鳖甲抗菌肽的原核表达条件优化及其抗菌活性. 昆虫学报, 59(1): 8-15]

Hao ZY, Zeng R, Shen PH, Wu B, Jiang CJ, 2011. Progress on the function and structure of serine protease inhibitor. *Genom. Appl. Biol.*, 30: 1290-1298. [郝振宇, 曾蓉, 申佩弘, 武波, 蒋承建, 2011. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构和功能研究进展. 基因组学与应用生物学, 30: 1290-1298]

Heit C, Jackson BC, Mcandrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, Daniel WN, Vasilis V, 2013. Update of the human and mouse serpin gene superfamily. *Hum. Genom.*, 7(1): 22.

Ke Y, Zeng SR, Zheng QH, 2012. Bioinformatics analysis of structure and function of serine protease gene from *Mucor racemosus*. *J. Zhejiang Univ.* (*Agric. Life Sci.*), 38(4): 370-376. [柯野, 曾松荣, 郑秋桦, 2012. 总状毛霉丝氨酸蛋白酶基因结构和功能的生物信息学分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 38(4): 370-376]

Kim BY, Lee KS, Wan H, Zou FM, Choi YS, Yoon HJ, Kwon, HW, Je YH, Jin BR, 2013. Anti-elastolytic activity of a honeybee (*Apis cerana*) chymotrypsin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430(1): 144-149.

Kim TK, Tirloni L, Radulovic Z, Lewis L, Bakshi M, Hill C, Vaz JIS, Logullo C, Termignoni C, Mulenga A, 2015. Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *Int. J. Parasitol.*, 45(9-10): 613-627.

Liu H, Ye XL, 2009. Construction of subtractive library against *Staphylococcus aureus* and analysis of immune-related genes in amphioxus. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, 25(8): 727-733. [刘辉, 叶湘漓, 2009. 文昌鱼抗金葡菌感染差减文库的构建及免疫相关基因分析. 中国生物化学与分子生物学报, 25(8): 727-733]

Lu H, Huang J, Li G, Ge K, Wu H, Huang Q, 2012. Expression, purification and characterization of recombinant human serine proteinase inhibitor Kazal-type 6 (SPINK6) in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 82: 144-149.

Lu S, Soares T S, Vaz Junior IS, Lovato DV, Tanaka AS, 2014. Rmcystatin3, a cysteine protease inhibitor from *Rhipicephalus microplus* hemocytes involved in immune response. *Biochimie*, 106: 17-23.

Ma YL, Hou F, Ma J, 2009. Seasonal changes in cold tolerance of desert beetle *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae) and their physiological mechanisms. *Acta Entomol. Sin.*, 52(4): 372-379. [马延龙, 候凤, 马纪, 2009. 荒漠昆虫光滑鳖甲的耐寒性季节变化及其生理机制. 昆虫学报, 52(4): 372-379]

Olson ST, Gettins PG, 2011. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 99: 185-240.

Qian C, Fang Q, Wang L, Ye GY, 2013. Functional studies of pacifastin proteinase inhibitor genes, *nvpp*-1 and *nvpp*-2, in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(8): 841-853. [钱岑, 方琦, 王磊, 叶恭银, 2013. 丽蝇蛹集金小蜂 pacifastin 蛋白酶抑制剂基因 *nvpp*-1 和 *nvpp*-2 的功能研究. 昆虫学报, 56(8): 841-853]

Qiu Y, Choo YM, Yoon HJ, Jia J, Cui Z, Wang D, Kim DH, Sohn HD, Jin BR, 2011. Fibrin(ogen)olytic activity of bumblebee venom serine protease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 255(2): 207-213.

Qiu Y, Lee KS, Choo YM, Kong D, Yoon HJ, Jin BR, 2013. Molecular cloning and antifibrinolytic activity of a serine protease inhibitor from bumblebee (*Bombus terrestris*) venom. *Toxicon*, 63(2): 1-6.

Tang Y, Wang Y, Pei ZH, Li WT, Zhang DD, Liu L, Kong LC, Liu SM, Jiang XY, Ma HX, 2016. A serine protease inhibitor from *Musca domestica* larva exhibits inhibitory activity against elastase and chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.*, 38(7): 1147-1153.

Wan H, Sik LK, Yeon KB, Zou FM, Joo YH, Ho JY, Li TH, Jin BR, 2013. A spider-derived Kunitz-type serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor and an elastase inhibitor. *PLoS ONE*, 8(1): e53343.

Wang L, Qiu JF, Qian C, Zhu BJ, Liu CL, 2014. Molecular cloning and expression profiles of a Kazal-type serine protease inhibitor gene in *Antheraea pernyi*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(4): 1003-1013. [王磊, 邱建烽, 钱岑, 朱保建, 刘朝良, 2014. 柞蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 *ApKTSPI* 基因克隆及表达特征分析. 应用昆虫学报, 51(4): 1003-1013]

Wang P, Rayhangul A, Liu ZY, 2012. Comparison and analysis of the methods of RNA isolation for *Anatolica polita borealis*. *Biotechnology*, 22(5): 36-39. [王鹏, 热依汗古丽·阿里木, 刘忠渊, 2012. 荒漠甲虫总 RNA 提取方法的比较与分析. 生物技术, 22(5): 36-39]

Xu X, Wang P, Liu ZY, 2015. Bioinformatics analysis of peptidoglycan recognition protein from *Anatolica polita*. *Biotechnology*, 25(2): 133-137. [徐鑫, 王鹏, 刘忠渊, 2015. 光滑鳖甲肽聚糖识别蛋白的生物信息学分析. 生物技术, 25(2): 133-137]

Zhang B, Wu T, Tang X, Zhang S, Xu Q, Zhao Y, Wang Y, Feng C, 2016. Cloning, expression and characterization of *Ostrinia furnacalis* serpin1, a regulator of the prophenoloxidase activation system. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 192: 9-20.

(责任编辑: 马丽萍)